

Poziom haptoglobiny, immunoglobuliny G i lizozymu w surowicy lisów polarnych w zależności od typu behawioru*)

KRZYSZTOF KOSTRO, ANDRZEJ ZOŃ*, ŁUKASZ JAROSZ, TADEUSZ STEFANIAK**

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Zakład Doświadczalny Instytutu Zootechniki, 39-331 Chorzełów

**Katedra Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Kostro K., Zoń A., Jarosz L., Stefaniak T.

Level of haptoglobin, IgG and lysozyme in sera of polar foxes in relation to their behavior

Summary

The aim of the studies was to evaluate the usefulness of determining the level of haptoglobin, IgG and lysozyme in sera for monitoring the state of health of breeding polar foxes of different behavior at the preparturient period. It was found that in determining the physiological parameters of unspecific humoral immunity, the behavior of the animals should be borne in mind. Significant differences exist in the examined parameters of unspecific immune responses and behavior of foxes. The highest and statistically significant level of haptoglobin, IgG and lysozyme was noted in fearful foxes in comparison to aggressive and confident animals. It can be assumed that lower phagocytic and bactericidal activity noted in the fearful foxes in comparison to that in the aggressive and confident animals is compensated by a higher bacteriolytic activity of lysozyme and a higher level of serum IgG.

Keywords: haptoglobin, immunoglobulin G, lysozyme, polar fox

System nowoczesnej hodowli mięsożernych zwierząt futerkowych zakłada stworzenie optymalnych warunków zdrowotnych dla zwierząt, co w zasadniczy sposób rzutuje na efekty produkcyjne i hodowlane. Spośród wielu czynników ryzyka coraz większą rolę odgrywa sprawność układu immunologicznego, od którego zależy w dużym stopniu podatność na infekcje i ich zejście. Silne pobudzenie układu immunologicznego określane często jako stres immunologiczny ma miejsce pod wpływem działania różnorodnych czynników szkodliwych. Przy niewielkim nasileniu działania tych czynników homeostaza układu immunologicznego nie jest naruszona. Wskaźniki dobrostanu powinny służyć ocenie warunków bytowych lisów hodowlanych i być wykorzystywane do opracowania strategii ochrony zdrowia oraz prognozowania efektów produkcyjnych w fermach hodowlanych mięsożernych zwierząt futerkowych (4, 6, 10, 11). W badaniach własnych stwierdzono, że u lisów polarnych wskaźniki komórkowej odpowiedzi immunologicznej zależą ściśle od behawioru (13). W odporności przeciwzakaźnej również humoralne czynniki odporności

nieswoistej, takie jak: przeciwciała naturalne, dopełniacz, układ properdyny, lizozym, laktoferyna, transferyna, spermina, czynniki chemotaktyczne, interferony, białka ostrej fazy, fibronektyna, β -lizyna, laktoferyna, laktoperoksydaza i czynniki chemotaktyczne pełnią istotną rolę (3, 7).

Brak jest jednak danych dotyczących kształtowania się wskaźników humoralnej odporności nieswoistej w zależności od zachowania behawioralnego.

Celem badań było określenie przydatności oznaczania haptoglobiny, immunoglobuliny G i lizozymu jako wskaźników immunologicznych w monitoringu zdrowotności lisów hodowlanych o różnym typie behawioru w okresie przygotowawczym do rozrodu.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Badania przeprowadzono w fermie, której obsadę stanowiło 81 samic lisów polarnych stada podstawowego. Stan sanitarny fermy oceniono jako zadowalający. Lisy były utrzymywane w tych samych warunkach i żywione systemem tradycyjnym według zalecanych dla tego gatunku zwierząt norm z uwzględnieniem dodatków mineralno-witaminowych oraz miały stały dostęp do wody. Od zwierząt tych pobrano próbki kału do badań parazytologicznych. Pomimo ujemnych wyników

*) Badania finansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Informatyzacji w ramach projektu nr 3PO6Z 05523.

badania parazytologicznego lisom stada podstawowego podano preparat przeciw pasożytniczy Foxverm, który stosowano zgodnie z zaleceniami producenta. W drugiej połowie listopada lisy stada podstawowego uodporniono przeciwko nosówce i zakaźnemu zapaleniu mózgu.

W okresie przygotowawczym do rozrodu (I połowa grudnia) z ogólnej liczby lisów stada podstawowego wyodrębniono 51 samic, które w zależności od typu zachowań behawioralnych podzielono na trzy grupy doświadczalne (grupa I, II i III) po 17 sztuk w każdej. Grupę I stanowiły zwierzęta agresywne, grupę II zwierzęta ufne i grupę III zwierzęta bojaźliwe. Podziału tego dokonano na podstawie przeprowadzonych testów behawioralnych: testu chwytania i testu pokarmowego.

Test chwytania wykonywano w klatce i polegał na obserwacji lisów w momencie ich łapania przy użyciu chwytaki. Zwierzęta zakwalifikowane do grupy agresywnych (grupa I) rzuciły się na klatkę, gryzły chwytakę i często warczały. Lisy z grupy bojaźliwych (grupa III) chowały się w kąt klatki, trzęsły się i nie uciekały, natomiast z grupy ufnych (grupa II) podchodziły do chwytającego, obwąchiwały chwytakę i zachowywały się spokojnie. Test pokarmowy polegał na obserwacji lisów w trakcie zadawania karmy w obecności pracowników obsługujących fermę. Lisy z grupy I podchodziły najwyżej do połowy klatki, uciekały i biegały po klatce. Zwierzęta z grupy bojaźliwych leżały i nie podchodziły do karmy, natomiast lisy ufne pobierały karmę w obecności obsługi.

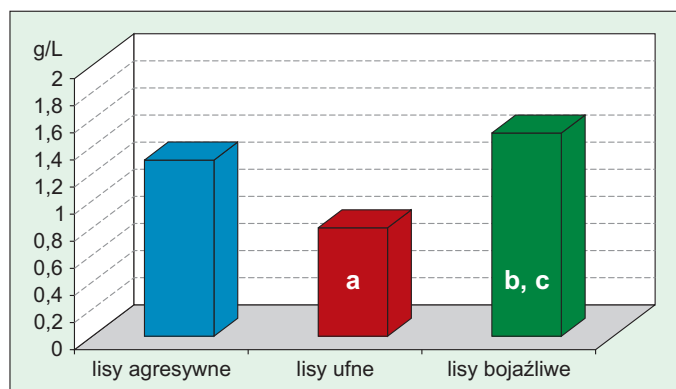
Oznaczanie poziomu haptoglobiny (Hp). Stężenie Hp w surowicy samic lisów polarnych oznaczano metodą gwałokolową na mikropłytkach według Jones i Mould (5). Ilościowe oznaczanie haptoglobiny oparte jest na pomiarze jej reaktywności z hemoglobina. Procedura obejmuje trzy etapy i bazuje na aktywności peroksydazowej kompleksu haptoglobina-hemoglobina. Stężenie haptoglobiny w surowicach standardowych i badanych wyrażano w postaci równoważnika czystej haptoglobiny, który obliczano przy wykorzystaniu preparatu czystej haptoglobiny. Metoda ta pozwala na szybkie oznaczenie i odczyt dużej ilości prób z wykorzystaniem automatycznego czytnika do mikropłytek.

Określenie bakteriolitycznej aktywności lizozymu (LZM). Bakteriolityczną aktywność lizozymu w surowicy określono metodą płytkową wobec *Micrococcus luteus* (Serva) według metody Grahama opisaną przez Zawistowskiego (15).

Oznaczanie poziomu przeciwciał klasy IgG. Stężenie surowiczej immunoglobuliny klasy IgG określono przy użyciu komercyjnego zestawu Dog IgG ELISA Quantitation Kit (firmy Bethyl Laboratories, Inc, USA) przeznaczonego do oznaczania poziomu IgG w surowicy psów.

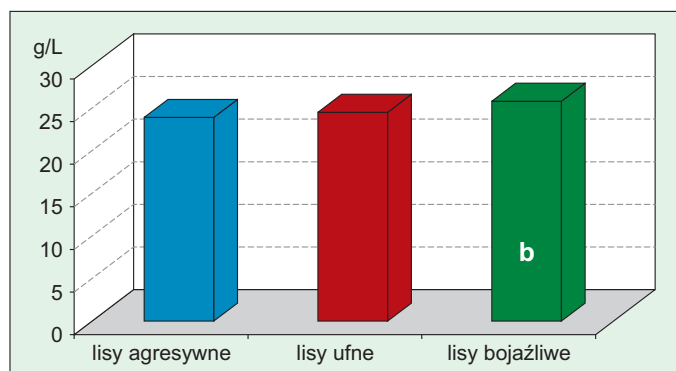
Wyniki i omówienie

Z danych zawartych na ryc. 1 wynika, że kształtowanie się surowiczego poziomu Hp u lisów polarnych było uwarunkowane typem zachowań behawioralnych. Najwyższe średnie wartości Hp stwierdzono w grupie lisów bojaźliwych i różniły się one istotnie tak w odniesieniu do grupy zwierząt agresywnych ($\alpha \leq 0,05$), jak i lisów ufnych ($\alpha \leq 0,01$). Natomiast najniższy



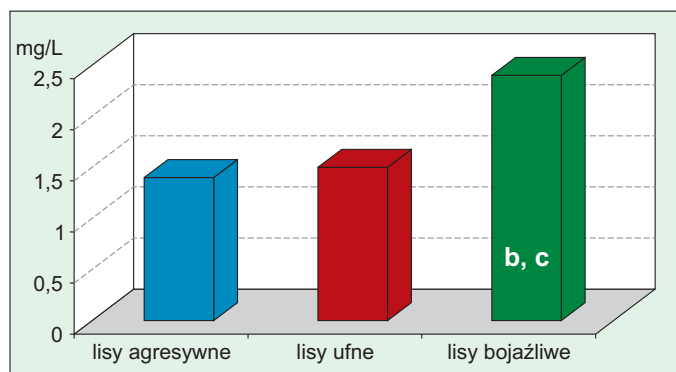
Ryc. 1. Surowiczy poziom Hp u lisów polarnych w zależności od typu zachowań behawioralnych ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: a – różnica statystycznie istotna pomiędzy grupą lisów agresywnych a ufną ($\alpha \leq 0,01$); b – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą lisów agresywnych a bojaźliwą ($\alpha \leq 0,05$); c – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą lisów ufnych a bojaźliwą ($\alpha \leq 0,01$)



Ryc. 2 Surowiczy poziom IgG u lisów polarnych w zależności od typu zachowań behawioralnych ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienie: b – różnica statystycznie istotna pomiędzy grupą lisów agresywnych a bojaźliwą ($\alpha \leq 0,01$)



Ryc. 3. Bakteriolityczna aktywność lizozymu w surowicy krwi obwodowej u lisów polarnych w zależności od typu zachowań behawioralnych ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: b – różnica statystycznie istotna pomiędzy grupą lisów agresywnych a bojaźliwą ($\alpha \leq 0,01$); c – różnica statystycznie istotna pomiędzy grupą lisów ufnych a bojaźliwą ($\alpha \leq 0,01$)

poziom Hp zanotowano w surowicy lisów ufnych, a jego średnie wartości różniły się statystycznie istotnie zarówno w stosunku do grupy zwierząt agresywnych ($\alpha \leq 0,01$), jak i bojaźliwych.

Kształtowanie się poziomu IgG w surowicy lisów polarnych w zależności od typu zachowań behawioralnych ilustruje ryc. 2. Z jej danych wynika, że najwyższe średnie wartości IgG stwierdzono w grupie lisów bojaźliwych, z tym, że różniły się one istotnie ($\alpha \leq 0,01$) jedynie w stosunku do lisów agresywnych (grupa I).

Bakteriolityczną aktywność lizozymu w surowicy krwi obwodowej lisów polarnych przedstawiono na ryc. 3. W grupie lisów bojaźliwych bakteriolityczna aktywność lizozymu osiągała najwyższe średnie wartości i różniły się one istotnie w stosunku do średnich wartości lizozymu uzyskanych w grupie zwierząt agresywnych (grupa I) i ufnych (grupa II). Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą lisów agresywnych a ufnych.

Sprawny układ immunologiczny oraz optymalna odpowiedź immunologiczna są jednym z czynników, które zapewniają dobrostan zwierząt hodowlanych oraz dobre efekty produkcyjne. Wszelkie zaburzenia w funkcji komórkowych i humoralnych mechanizmów odporności nieswoistej są ważną przyczyną uzyskiwania niskich efektów hodowlanych. Możliwość zapobiegania niekorzystnym wpływom czynników szkodliwych zależy w dużym stopniu od właściwego monitoringu stanu czynnościowego układu immunologicznego (5, 8, 9, 12). Badania własne wykazały, że przy oznaczaniu fizjologicznych wartości wskaźników humoralnej odporności nieswoistej u lisów należy uwzględnić typ zachowania behawioralnego, ponieważ występują wyraźne różnice w zakresie badanych parametrów, uwarunkowane typem behawioru. Najwyższe i statystycznie istotne średnie wartości IgG i bakteriolitycznej aktywności lizozymu stwierdzono u lisów bojaźliwych w porównaniu do zwierząt agresywnych i ufnych, u których z kolei notowano istotnie wyższe średnie wartości wskaźników komórkowej odporności nieswoistej (13). Uzyskane wyniki są trudne w interpretacji, ponieważ nie zostały opracowane wartości referencyjne dla IgG i lizozymu u lisów. Można jedynie przypuszczać, iż istotnie niższa aktywność fagocytarna i bójcza u lisów bojaźliwych w porównaniu do zwierząt agresywnych i ufnych jest kompensowana bakteriolityczną aktywnością lizozymu i poziomem IgG w surowicy.

Wszystkie funkcje ustrojowe podlegają integracji poprzez układ nerwowy, wydzielania wewnętrznego i immunologiczny, do których włączono także odpowiedź ostrej fazy (OOF) (10). Odpowiedź ostrej fazy stanowi element odporności nieswoistej i obejmuje najwcześniej zachodzące zmiany w organizmie pod wpływem działania czynników szkodliwych, takie jak zmiany: behawioralne, hormonalne, hemodynamiczne, hematologiczne i metaboliczne oraz zmiany w stężeniach niebiałkowych składników osocza (7). W przebiegu odpowiedzi ostrej fazy występują też zmiany syntezy szeregu białek osocza określanymi jako białka ostrej fazy (bof). U lisów do białek ostrej fazy nale-

ży białko C-reaktywne (CRP), surowiczy składnik amyloidu A (SAA) i haptoglobina (Hp) (10). Uzyskane dane przez Krakowskiego (14) jednoznacznie wskazują na przydatność oznaczania surowiczego poziomu haptoglobiny jako jednego z kryteriów oceny dobrostanu lisów w okresie rozrodu. Z danych uzyskanych w badaniach własnych wynika, że istotny wpływ na kształtowanie się poziomu Hp u lisów polarnych w warunkach fizjologicznych ma typ zachowań behawioralnych zwierzęcia. Najwyższe i statystycznie istotne średnie wartości haptoglobiny notowano w grupie lisów bojaźliwych, natomiast najniższe u lisów ufnych. W piśmiennictwie światowym brak jest informacji dotyczących wartości referencyjnych Hp u lisów polarnych, co znacznie utrudnia interpretację uzyskanych wyników. U zwierząt mięsożernych na kinetykę reakcji ostrej fazy ma wpływ wiele czynników, wśród których główną rolę pełnią cytokiny prozapalne i hormony glikokortykoidowe. Jednocześnie z uwalnianiem cytokin prozapalnych dochodzi do uwalniania cytokin przeciwzapalnych, a zachowanie równowagi między czynnikami pro- i przeciwzapalnymi ma kluczowe znaczenie dla utrzymania prawidłowej homeostazy organizmu.

Badania własne wykazały też, że kształtowanie się poziomu Hp w surowicy lisów polarnych w warunkach fizjologicznych zależy również od zachowań behawioralnych. Mając na uwadze, że te zwierzęta przebywały w tych samych warunkach zoohigienicznych oraz były identycznie żywione, można przyjąć, że zaobserwowane różnice w zakresie kształtowania się Hp w badanych grupach lisów są uwarunkowane typem behawioru zależnym od genomu. Czynnikiem indukującym zmiany stężeń białek ostrej fazy jest m.in. stres zarówno o charakterze fizjologicznym (somatycznym), jak i emocjonalnym (neurogennym). Neurohormonalne mechanizmy stresu, aktywując układ współczulno-rdzeniowo-nadnerczowy i podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowy, pobudzają u zwierząt morfologiczne i czynnościowe procesy adaptacyjne, których celem jest przeciwstawienie się zmianom stresowym i przywrócenie zaburzonej homeostazy organizmu (1, 2, 10). Pierwsza grupa reakcji stresowych obejmuje stan bezpośredniej aktywacji osi HPA w wyniku wzrostu produkcji czynnika wyzwalającego kortykotropinę (CRH-corticotropin-releasing hormone). Natomiast druga grupa aktywuje oś HPA drogą pośrednią w wyniku uwalniania IL-1 i TNF- α przez aktywowane makrofagi. Uruchomienie osi HPA powoduje uwalnianie hormonów glikokortykoidowych pełniących rolę przekaźników pomiędzy centralnym układem nerwowym a immunologicznym. Wzrost poziomu glikokortykoidów moduluje syntezę i uwalnianie białek ostrej fazy przez hepatocyty, produkcję immunoglobulin przez komórki B oraz ogranicza nadmierny rozwój procesów zapalnych (11). Przedłużające się oddziaływanie bodźców stresogennych prowadzi do przesunięcia profilu komórek Th1 na domi-

nację profilu typu Th2 i jego hamującego wpływu na produkcję cytokin przez limfocyty Th1. Pośrednim wskaźnikiem wzrostu poziomu limfocytów Th2 pod wpływem działania stresu jest wzrost stężenia białek ostrej fazy. W tym przypadku głównym sygnałem indukującym syntezę białek przez hepatocyty jest IL-6 uwalniana w zwiększonej ilości przez aktywowane komórki Th2 (10, 11). Zatem może to sugerować, że najwyższy i istotny poziom Hp w surowicy lisów bojaźliwych w porównaniu do zwierząt ufnych i agresywnych jest wynikiem dominacji profilu Th2 pod wpływem stresu. Immunosupresja powodowana stresem wiąże się ze wzrostem surowiczego poziomu glikokortykoidów i TNF- α oraz obniżeniem krążących limfocytów. Przedstawione w niniejszej pracy dane wskazują, że w selekcji hodowlanej lisów polarnych, niezależnie od oceny cech użytkowych, mogą być wykorzystywane wyniki badań nad odpornością u poszczególnych typów zachowań behawioralnych. Stwierdzone różnice w zakresie badanych parametrów humoralnej odporności nieswoistej u lisów polarnych w zależności od zachowań behawioralnych mogą rzutować na zróżnicowaną podatność zwierząt w obrębie tej odmiany na niektóre infekcje już na poziomie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej.

Podsumowując uzyskane wyniki badań należy stwierdzić, że w czasie zestawiania stada podstawowego lisów hodowlanych należy eliminować zwierzęta o temperamencie bojaźliwym oraz agresywnym, aby można było uzyskać wysokie i zadawalające wskaźniki rozrodu. Z obserwacji własnych oraz hodowców wynika, że zwierzęta o skrajnym typie zachowań behawioralnych, narażone na stres, charakteryzują się niskimi wskaźnikami produkcyjnymi. Lisy agresyw-

ne, a zwłaszcza bojaźliwe, gorzej odchowują potomstwo, a skóry pozyskane od tych zwierząt charakteryzują się gorszymi cechami futrzarskimi.

Piśmiennictwo

1. *Chrousos G. P.*: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. England J. Med.* 1995, 332, 1351-1359.
2. *Connor T. J., Leonard B. E.*: Depression, stress and immunological activation: The role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci.* 1998, 62, 583-589.
3. *Gliński Z., Kostro K.* (red.): *Immunobiologia*. Wyd. PWRiL, Warszawa 2004.
4. *Gliński Z., Kostro K.* (red.): *Podstawy hodowli lisów i norek. Profilaktyka i zwalczanie chorób*. PWRiL, Warszawa 2002.
5. *Jones G. E., Mould D. L.*: Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Research in Veterinary Science* 1984, 37, 87-92.
6. *Kolacz R., Bodak E.*: Dobrostan zwierząt i kryteria jego oceny. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 147-154.
7. *Kostro K., Gliński Z.* (red.): *Białka ostrej fazy u zwierząt*. Wyd. AR, Lublin 2003.
8. *Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.*: Białka ostrej fazy jako ligandy komórek układu immunologicznego. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 929-933.
9. *Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.*: Zachowanie się białek ostrej fazy u zwierząt w stanach chorobowych i stresie. *Annales UMCS s. DD, Lublin* 2001, 56, 49-56.
10. *Kostro K., Krakowski L., Gliński Z., Krakowski M.*: Białka ostrej fazy a ochrona zdrowia mięsożernych zwierząt futerkowych. *Annales UMCS s. DD, Lublin* 2002, 57, 169-176.
11. *Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Gliński Z.*: Wykorzystanie białek ostrej fazy w diagnostyce i monitorowaniu chorób zwierząt mięsożernych. *Zesz. Nauk. AR, Wrocław* 2000, 390, 75-82.
12. *Kostro K., Wołoszyn S.*: Porównanie wybranych parametrów odporności u lisów srebrzystych i polarnych. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 255-261.
13. *Kostro K., Zoń A., Bielański P., Jarosz Ł.*: Komórkowa odporność nieswoista u lisów hodowlanych w zależności od zachowań behawioralnych. *Medycyna Wet.* 2006. (w druku).
14. *Krakowski M.*: Wpływ immunostymulatorów na wybrane wskaźniki immunologiczne krwi oraz efekty reprodukcyjne samic lisów polarnych w okresie rozrodu. *Praca doktorska*. Lublin 2004.
15. *Zawistowski S.*: *Technika histologiczna, podstawy histologii oraz histologia*. PZW, Warszawa 1975.

Adres autora: prof. dr hab. Krzysztof Kostro, Al. Sikorskiego 3/81, 20-814 Lublin